

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620101152317

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

\_\_\_\_\_ 硕 士 \_\_\_\_\_ 学 位 论 文

# 对虾白斑综合症病毒启动子文库的构建及 极早期基因的筛选

The Construction of Promoter-library and the Screening of  
Immediate-early genes of White Spot Syndrome Virus

卢晓惠

指导教师姓名: 徐 洵 教授

杨 丰 研究员

李 钊 副研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 6 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2013 年 06 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目录

目录.....	I
CONTENTS .....	IV
摘要.....	VII
Abstract.....	VIII
1 前言 .....	1
1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况 .....	1
1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及其命名.....	1
1.1.2 对虾白斑综合症病毒的大小和形态结构.....	2
1.1.3 对虾白斑综合症病毒感染宿主症状和组织病理学特征.....	2
1.1.4 对虾白斑综合症病毒的生活周期.....	3
1.2 对虾白斑综合症病毒的分离纯化 .....	5
1.3 对虾白斑综合症病毒（WSSV）基因组学研究概况.....	6
1.3.1 WSSV 全基因组序列的测定 .....	6
1.3.2 对虾白斑综合症病毒基因组的转录和调控.....	8
1.4 对虾白斑综合症病毒蛋白的功能研究 .....	10
1.5 启动子简介以及 WSSV 启动子研究现状.....	13
1.6 DNA 病毒极早期基因简介及 WSSV 极早期基因研究现状 .....	14
1.6.1 DNA 病毒极早期基因的定义 .....	14
1.6.2 DNA 病毒极早期蛋白的功能 .....	14
1.6.3 DNA 病毒极早期基因的筛选方法 .....	15
1.6.4 对虾白斑综合症病毒极早期基因研究现状.....	16
1.7 本论文研究的内容、目的和意义 .....	17
2 实验材料与方法 .....	18
2.1 实验材料 .....	18

2.1.1	实验动物.....	18
2.1.2	细胞及培养基.....	18
2.1.3	菌株与质粒.....	18
2.1.4	酶类或其他蛋白质.....	18
2.1.5	其他试剂.....	18
2.1.6	引物合成及测序.....	19
2.2	主要仪器 .....	19
2.3	常用溶液和培养基的配置 .....	20
2.4	实验方法 .....	21
2.4.1	WSSV 启动子文库的构建 .....	21
2.4.2	昆虫细胞 High Five 的转染 .....	28
2.4.3	细胞的固定和免疫荧光.....	28
2.4.4	螯虾血细胞和造血干细胞的原代培养.....	29
2.4.5	WSSV 极早期基因转录产物的制备 .....	29
2.4.6	候选极早期基因的 RT-PCR 验证 .....	30
3	结果与分析 .....	32
3.1	WSSV 基因启动子文库的构建.....	32
3.1.1	WSSV 基因组启动子调控区克隆的策略 .....	32
3.1.2	WSSV 基因组启动子片段的 PCR 扩增.....	34
3.2	WSSV 启动子文库的分析.....	35
3.2.1	WSSV 启动子文库转染 High Five 细胞.....	35
3.2.2	WSSV 基因组的启动子分析 .....	37
3.3	WSSV 极早期基因的分析及功能预测.....	39
3.3.1	候选极早期基因的确认.....	39
3.3.2	WSSV 极早期基因的功能预测 .....	41
3.3.3	在血细胞和造血组织细胞中 WSSV 极早期基因表达上的差异 ..	42
4	讨论 .....	45
附录 I WSSV 启动子片段在基因组中截取位置及两端引物的设计表		

.....	49
附录 II 候选极早期基因 RT-PCR 实验所用引物.....	56
参考文献 .....	58
致谢.....	66

厦门大学博士论文摘要库

# CONTENTS

<b>Chinese contents.....</b>	<b>I</b>
<b>English contents .....</b>	<b>IV</b>
<b>Chinese abstract.....</b>	<b>VII</b>
<b>English abstract.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Reserch of white spot syndrome virus .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Finding and naming of white spot syndrome virus.....	1
1.1.2 Size and structure of white spot syndrome virus .....	2
1.1.3 Symptom and pathology of white spot syndrome virus.....	2
1.1.4 Life cycles of white spot syndrome virus .....	3
<b>1.2 Isolation and detection technology of WSSV .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Genomics of white spot syndrome virus .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Sequencing of WSSV genomics .....	6
1.3.2 Transcription and regulation of WSSV.....	8
<b>1.4 Proteomics research of white spot syndrome virus .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Introduction of promoter and current research status of WSSV     promoters.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Introduction of DNA virus immediate-early(IE) genes and current     research status of WSSV IE genes.....</b>	<b>14</b>
1.6.1 Definition of DNA virus IE genes .....	14
1.6.2 Function of IE proteins .....	14
1.6.3 Screening technique of IE genes.....	15
1.6.4 The IE genes and proteins research status .....	16
<b>1.7 Contents, purpose and significance of thesis .....</b>	<b>17</b>
<b>2 Materials and methods.....</b>	<b>18</b>

<b>2.1</b>	<b>Materials .....</b>	<b>18</b>
2.1.1	Experimental Animals .....	18
2.1.2	Cells and medium .....	18
2.1.3	Strains and plasmids .....	18
2.1.4	Enzymes or other proteins .....	18
2.1.5	Other reagent.....	18
2.1.6	Primer synthesis and sequencing .....	20
<b>2.2</b>	<b>Main apparatus .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>The preparation of common solutions and medium .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Methods.....</b>	<b>28</b>
2.4.1	The Construction of WSSV promoters library .....	28
2.4.2	Transfection of insert cells High Five.....	29
2.4.3	Fixation of Cells and immuno-fluorescence .....	29
2.4.4	Primary culture of crayfish blood cells and hematopoietic stem cells .....	30
2.4.5	Preparation of immediate-early(IE) genes transcription products .....	31
2.4.6	Validation of candidate immediate-early(IE) genes by RT-PCR .....	32
<b>3</b>	<b>Results and analysis.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>The construction promoter library of WSSV gene .....</b>	<b>32</b>
3.1.1	Strategy of clone of WSSV promoter regulatory region .....	34
3.1.2	PCR of WSSV genome promoter fragment.....	35
<b>3.2</b>	<b>The analysis of WSSV promoter library .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3</b>	<b>Analysis and potential function of WSSV IE genes .....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Test of candidate WSSV IE genes .....	39
3.3.2	potential function of WSSV IE genes.....	39
3.3.3	Expression difference of IE genes in hemocyte and hematopoietic stem cells.....	41
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>42</b>
<b>Appendix I: the design of primers of WSSV promoters and location</b>		



<b>of the promoters in the WSSV genome.....</b>	<b>45</b>
<b>Appendix II : The primers of candidate immediate-early(IE) genes in RT-PCR experiment.....</b>	<b>56</b>
<b>References.....</b>	<b>58</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>66</b>

## 摘要

在病毒感染过程中,病毒基因的转录是由宿主以及病毒编码的转录因子共同调控的。目前人们对对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)基因的转录调控机制了解的还比较有限。为了提供用于病毒基因转录调控研究的一个平台,本论文构建了对虾白斑综合症病毒的启动子文库。该文库包含了WSSV基因组中154个开放阅读框(open reading frame, ORF)上游约500 bp调控区序列。这些调控区都被克隆到PIZ $\Delta$ IE/V5-EGFP载体中,连接在报告基因EGFP的上游。这一启动子文库可以用于研究宿主和病毒的蛋白对WSSV基因转录的调控。为了对WSSV基因启动子的性质有个初步的了解,我们将文库中的154个质粒分别转染到High-five细胞中,并检测EGFP的表达。结果表明,其中17个WSSV启动子区可以在high-five细胞中激活报告基因的转录。这些启动子区分别是: *wsv045P*, *wsv119P*, *wsv172P*, *wsv188P*, *wsv192P*, *wsv207P*, *wsv226P*, *wsv260P*, *wsv285P*, *wsv299P*, *wsv343P*, *wsv407P*, *wsv447P*, *wsv482P*, *wsv486P*, *wsv489P*, *wsv513P*。而其余的137个启动子区则不能在high-five细胞中激活EGFP的表达。进一步的分析表明,在17个表现出活性的启动子中,有15个含有TATA box;同时,CCACCC序列在这些启动子上出现的频率也很高。

此外,上述17个WSSV基因启动子能够被宿主的转录因子所启动,符合病毒极早期基因转录的特征。RT-PCR分析表明,其中11个基因, *wsv119*, *wsv172*, *wsv188*, *wsv207*, *wsv226*, *wsv285*, *wsv299*, *wsv343*, *wsv447*, *wsv482*, *wsv489*在虾造血组织细胞经蛋白质合成抑制剂放线菌酮(CHX)预处理后再感染WSSV的条件下依然能够转录,说明它们属于WSSV的极早期基因。在此基础上,我们分析了已发现的20个极早期基因在血细胞和造血组织细胞表达上的差异。结果表明,在CHX存在的情况下,所有20个待测基因都可以在造血组织细胞中转录,而只有8个能够在原代血细胞中转录。提示了WSSV在宿主不同组织的感染增殖情况存在一定的差异。

**关键词:** WSSV; 启动子文库; 极早期基因

## Abstract

Viral gene transcription is regulated by both the cellular and viral transcription factors. Until now the transcriptional regulation mechanism of White Spot Syndrome Virus (WSSV) is not fully understood. In this thesis, to build up a platform for the research on WSSV gene transcriptional regulation, a WSSV promoter library containing the 5' regulatory regions of 154 WSSV ORFs was constructed. The DNA fragments immediately upstream of the start codons of WSSV ORFs, which were expected to contain core promoter elements, were cloned into PIZ $\Delta$ IE/V5-EGFP. To get a general view of the promoter regions of WSSV genes, we transfect each of the library construct into High-five cells. The results showed that among the 154 WSSV promoter regions analysed, only 17 could activate the expression of the reporter gene EGFP. These promoters are *wsv045P*, *wsv119P*, *wsv172P*, *wsv188P*, *wsv192P*, *wsv207P*, *wsv226P*, *wsv260P*, *wsv285P*, *wsv299P*, *wsv343P*, *wsv407P*, *wsv447P*, *wsv482P*, *wsv486P*, *wsv489P*, *wsv513P*. Further analysis showed that 15 of the 17 active promoters contain a TATA box, and a CCACCC motif was also frequently presented.

In addition, since 17 WSSV genes contain promoters can be activated solely by host transcription factors, we asked if they are immediate early genes. RT-PCR analysis showed that 11 genes, *wsv119*, *wsv172*, *wsv188*, *wsv207*, *wsv226*, *wsv285*, *wsv299*, *wsv343*, *wsv447*, *wsv482* and *wsv489* could be transcribed in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) when crayfish hematopoietic tissue cells are infected by WSSV, indicating they are IE genes. Further investigation showed that WSSV IE genes were differentially expressed in WSSV infected crayfish hemocyte and hematopoietic tissue cells, indicating a difference of viral replication in these two cells.

**Key words:** WSSV, promoter library, immediate early genes

# 1 前言

## 1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况

### 1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及其命名

对虾在分类学上隶属节肢动物门(Arthropoda)，甲壳纲(Crustacea)，十足目(Decapoda)，对虾科(Penaeidae)，是一种具重要经济价值的海洋生物。近几十年来，随着全球对虾消费市场的不断扩大，加上海洋中能捕捞对虾的量逐年减少已无法满足市场的需求，对虾养殖业便逐渐兴起。我国对虾养殖起步于 20 世纪 80 年代初期，经过数十年的不断努力发展，目前我国对虾产量已经位居世界第一<sup>[1]</sup>。然而，在 1992-1993 年间，在我国南部，包括台湾省在内的一些地区引发了一种新的对虾爆发性疾病，造成了养殖对虾的大规模死亡。随后，该病毒又迅速蔓延到了日本、韩国等东南亚各地区，以及南、北美洲、欧洲等地的养殖场。并在此后的十几年间内给全球对虾养殖业造成了巨大的经济损失。该病毒以其发病快、致死率高、传播速度快，目前已成为全球范围内限制养虾业发展的最主要因素之一，其典型症状是病虾头胸甲部位可见大量的 0.5-3 mm 大小不等的白色斑点<sup>[2-4]</sup>(图 1-1)。

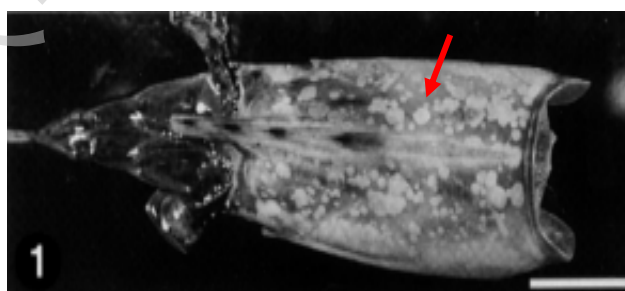


图 1-1 白斑病毒感染的对虾头部甲壳呈现的白斑

自从对虾白斑综合症出现以来，引起了各地研究人员的巨大兴趣。他们相继纯化分离了其病原体——一种新型的非包涵体型杆状病毒，当时根据所分离病毒株的地域分布、原始宿主、形态发生以及主要病理症状，世界各地给不同分离株赋予了不同的名称<sup>[5-11]</sup>。然而随后 Wang<sup>[12]</sup>用 PCR 技术比较研究了不同分离株的对

虾白斑病毒 DNA，发现 PCR 产物只有少许差别，研究结果推测为同一种新型病毒。随后，Lightner<sup>[13]</sup>等建议将这类杆状病毒统一命名为白斑综合症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV)。

### 1.1.2 对虾白斑综合症病毒的大小和形态结构

电镜观察显示，WSSV 是一类杆状型的非包涵体病毒。完整病毒颗粒<sup>[3]</sup>长约 210-380 nm，宽约 70-167 nm。病毒的结构主要由囊膜 (envelop)、核衣壳 (nucleocapsid)、以及两者之间的被膜层 (tegument) 构成。病毒粒子的囊膜约 6-7 nm 厚，是由内外两层膜及中间的间质构成。有些纯化的病毒颗粒上具有一个尾状结构，它可能是病毒囊膜的延伸<sup>[3]</sup>。病毒的核衣壳位于囊膜之内，长约 180-420 nm，宽约 54-85 nm，厚约 6 nm。由 14-19 个沿长轴排列的结构单元组成，每个结构单元约为 23 nm 厚，两两之间有约 6 nm 的间隔。每个结构单元由一些小环沿长轴叠加而成，每一个小环由两列平行排列的 12-14 个直径 8-10 nm 的球状蛋白亚基构成，这些球状亚基主要成分是 VP664 蛋白<sup>[3]</sup>。核衣壳内部是一高电子密度的区域，由病毒基因组 DNA 和 DNA 结合蛋白 VP15 构成。核衣壳形状由球状亚基的组织方式决定，包括圆柱形和卵圆形两种<sup>[2-3]</sup>。图 1-2<sup>[3]</sup>展示了 WSSV 病毒的结构。

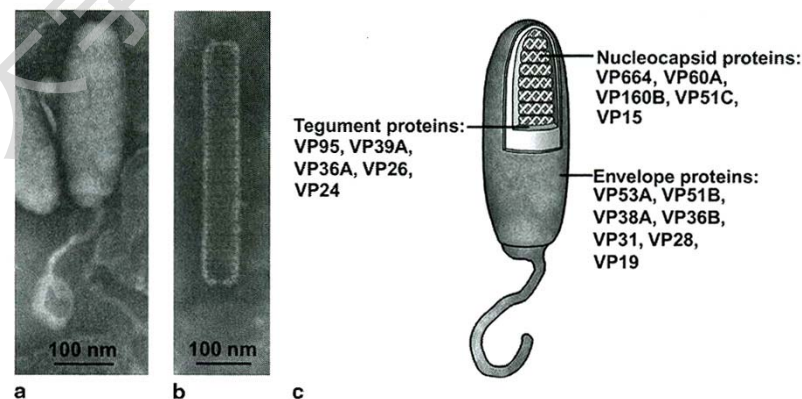


图 1-2 对虾白斑综合症病毒结构<sup>[3]</sup>

a.完整病毒颗粒；b.核衣壳；c.病毒结构示意图

### 1.1.3 对虾白斑综合症病毒感染宿主症状和组织病理学特征

WSSV 具有广泛的宿主，在甲壳纲和昆虫纲动物中均有其敏感宿主<sup>[14-22]</sup>。其

中,几乎所有的对虾都能够被 WSSV 感染。已发现该病毒能感染的养殖对虾有:斑节对虾(草虾)(*Penaeus monodon*)、南美白对虾(凡纳滨对虾)(*Litopenaeus Vannamei*)、日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、刀额新对虾(砂虾)(*Metapenaeus ensis*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、印度虾(*P.indicus*)、墨吉对虾(*P.merguiensis*)、长毛对虾(*P.penicillatus*)、熊虾(*P.semisulcatus*)、美国蓝虾(*P.setiferus*)等。此外, WSSV 还感染其它生活在海水、淡水,以及半咸水的甲壳动物,例如螯虾、蟹、龙虾、寄居蟹;以及轮虫、箭虫、多毛虫、甚至一些水生昆虫<sup>[3, 19, 21-23]</sup>。有些虾蟹被 WSSV 感染之后未必发病,它们只是作为 WSSV 感染对虾的中间宿主<sup>[24]</sup>。广泛的宿主范围不仅给 WSSV 的防治带来一定的困难,对于水产养殖地区的生态环境的安全性也有一定的影响。

感染 WSSV 的患病对虾一般表现会表现出下列特征:首先易出现行动缓慢,昏睡,减少觅食的症状,逐渐虾壳变软,对外界的刺激反应逐渐迟钝。而后完全停止觅食,失去平衡浮于水面,最终很快死亡。一般对虾感染 WSSV 1-2 天后,由于表皮色素细胞扩散表皮色易轻度变红或暗红,2 天后在头胸甲上可观察到针尖样大小圆型或不规则白色斑点,这种斑点是异常的钙沉积,为 WSSV 感染对虾后对虾白斑综合症的典型特征。

组织病理观察发现,病毒侵染对虾的主要部位有上皮组织、结缔组织和造血组织;在病虾的鳃、胃和肠上皮细胞及粘膜下层结缔组织、淋巴器官、触角腺、心脏、肝胰腺及尾扇等组织器官处都可以观察到不同程度的病变;而肌肉组织中病毒较少<sup>[25-30]</sup>。

#### 1.1.4 对虾白斑综合症病毒的生活周期

目前对 WSSV 的生活周期的认识并不完善,现有的认识主要集中在 WSSV 新病毒颗粒生成的部分。与其它双链 DNA 病毒一致, WSSV 的复制和组装也是在宿主细胞核内进行的,感染对虾活体实验表明病毒通常病毒在 24 小时内即可完成一个生命周期。

WSSV 的形态生成大致包括了以下几个阶段<sup>[2-3]</sup>:

(1) 在病毒感染的早期,感染细胞的细胞核出现轻微的肥大,由病毒的蛋白形成的纤维状结构组成的病毒核小体出现。细胞的内质网膨大,出现许多游离的核

糖体。

(2) 细胞核内的纤维状物质介导了病毒膜结构的形成，病毒的核心物质被包裹到膜结构中，这时在病毒来源的基质和边聚的染色质之间出现了 Crowdry A 氏包涵体。细胞核膨大，变圆。

(3) 病毒核衣壳逐渐由一端到另一端生成，同时囊膜逐步包裹核衣壳。此时细胞内的 Crowdry A 氏包涵体变小，边聚染色质消失，核膜破裂，细胞器出现异常。

(4) 病毒核衣壳完成组装，随后核衣壳被囊膜完全包裹。

(5) 病毒粒子呈卵圆形、形成尾状结构，此时病毒的核衣壳在 DNA 与 VP15 的包装作用下被压缩变短。

(6) 成熟的病毒颗粒呈椭圆形，外有封闭的囊膜及尾状结构，内含成熟核衣壳。在有些情况下病毒的核衣壳形成是单独进行的，在最后的阶段再统一由囊膜进行包裹。在病毒感染的最后阶段，细胞破裂，释放成熟子代病毒颗粒。

根据现有的数据，研究者对 WSSV 的生活周期进行了推测，绘制了 WSSV 复制周期的示意图（图 1-3），但是有关其中 WSSV 是如何进入细胞，并被运送到细胞核的过程实际上并不清楚。

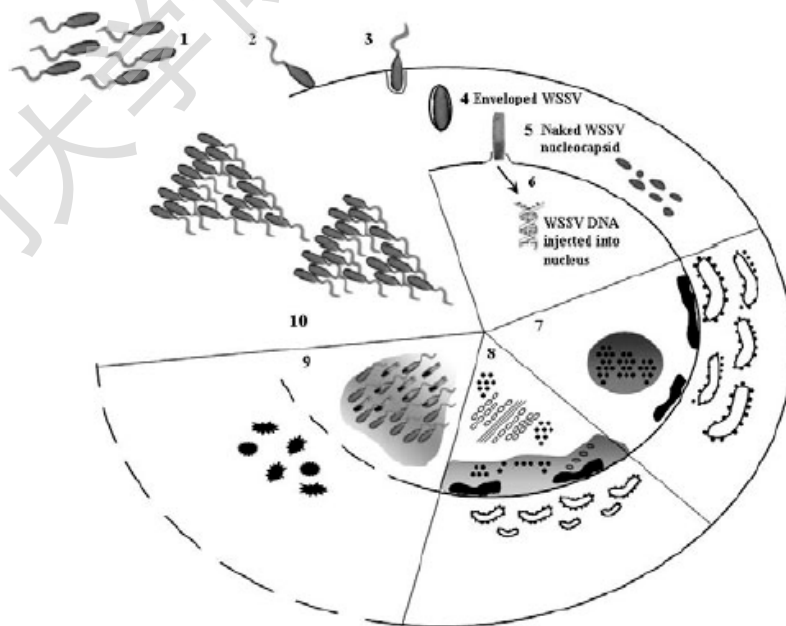


图 1-3 WSSV 生活周期示意图<sup>[2]</sup>

1-3: 游离的病毒在与宿主细胞膜识别之后通过内吞进入细胞质; 4-6: 脱去囊膜之后核衣壳进入细胞核, 裸露基因组 DNA 并进行复制; 7: 细胞核内出现早期病毒基质, 染色质边缘化粗面内质网膨大; 8: 边缘化的染色质转变为高密度环状区, 核内有由膜物质形成的囊泡和丝状的病毒核小体形成; 9: 新病毒组装核膜破裂, 细胞器被破坏; 10: 细胞解体, 新病毒释放。

## 1.2 对虾白斑综合症病毒的分离纯化

分离纯化 WSSV 是确诊白斑综合症病的论据, 也是进行白斑综合症病的监测、预防和进一步研究 WSSV 必须取得的材料。目前 WSSV 感染用对虾价格昂贵, 加上饲养不易, 所以寻找 WSSV 替代的宿主, 建立感染动物模型是非常必要的。试验表明 WSSV 在淡水克氏螯虾(*Procambarus clarkia*)体内的增殖过程和增殖特性与其在对虾体内的相应行为非常相似; 从发病或死亡螯虾体内观察到的病毒粒子, 其形态大小与从中国对虾中分离的病毒粒子基本相似或相同<sup>[31-34]</sup>。同时, 克氏螯虾对于我们的研究还具有市场价格低廉, 一年四季可以获得, 室内人工喂养容易等优势, 目前, 克氏螯虾已经成为实验室 WSSV 研究中最常用的替代宿主。

1995 年, 台湾地区最早报道了 WSSV 的分离纯化<sup>[12, 25]</sup>。研究者收集了受病毒感染的斑节对虾, 分离纯化得到 WSSV 病毒粒子后用 Sal I 酶切后克隆至质粒 pUC19 中, 建立 WSSV 基因组文库。研究表明该病毒具有双链 DNA, 预测大小超过 150 kb。不过随后的研究结果证实所获得的病毒 DNA 是不完整的。1997 年, Yang<sup>[35]</sup>建立了一种快速有效提取、纯化 WSSV 核衣壳及其完整基因组 DNA 的方法, 并首次获得了纯的完整病基因组 DNA, 大小约为 290 kb。2000 年 van Hulten 等<sup>[36-37]</sup>从泰国收集患病草虾的血清中分离到完整的病毒粒子, 并通过蛋白 N 端测序鉴定了 3 条主要的 WSSV 结构蛋白 (VP26、VP28、VP24)。随后作者又利用同样的方法从感染病毒的克氏螯虾的血清中分离到完整的病毒粒子, 并鉴定了另外 2 条主要的 WSSV 结构蛋白 (VP15、VP19)<sup>[38]</sup>。

以往大部分病毒纯化的方法并不理想, 病毒纯化的效率极低, 纯度也不高, 而且纯化的病毒样品中包含较多的细胞污染物, 这就制约了 WSSV 结构蛋白的鉴定及其功能研究工作的开展。到目前为止, 完整病毒纯化最常用的方法就是采用密度梯度超速离心从感染病毒的克氏螯虾的血清中提取。本实验室 2005 报道了一种简单有效的从感染螯虾的组织中提取大量完整病毒粒子的方法<sup>[39]</sup>。它不



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库